

# von Willebrand 因子 (vWF) のヒト Type III collagen への結合に関する研究

## II. von Willebrand 病および血友病A患者 血漿中の vWF の collagen 結合

奈良県立医科大学小児科学教室

西 久 保 敏 也

### STUDY ON BINDING OF VON WILLEBRAND FACTOR TO HUMAN TYPE III FIBRILLAR COLLAGEN II. COLLAGEN BINDING OF VON WILLEBRAND FACTOR (VWF) OF THE PLASMA IN PATIENTS WITH VON WILLEBRAND DISEASE AND HEMOPHILIA A

TOSHIYA NISHIKUBO

*Department of Pediatrics, Nara Medical University*

Received September 28, 1990

**Summary :** The percentage of binding of vWF to human Type III fibrillar collagen was determined in plasma samples from 20 patients with various types of von Willebrand disease (vWD) and 27 patients with hemophilia A. The levels of collagen binding were normal, ranging from 83.6 to 90.0% in 9 cases of Type I vWD. In 7 cases of Type IIA vWD and 3 cases of Type IIB vWD, the rates of collagen binding were 42.0~76.1% and 68.0~80.0% respectively. A case of Type IIC vWD showed a remarkable decrease, with 35.8%. On the other hand, 27 cases of hemophilia A showed normal values with 91.0~98.7%.

When plasma samples absorbed with collagen and then vWF multimer in the supernatant were analysed by agarose-gel electrophoresis, the larger multimer of normal vWF showed the strongest affinity to collagen, while the smallest one was poor.

Changes of vWF multimer in Type I vWD showed the same results as those of normal plasma, but Types IIA, IIB and IIC vWD showed a decreased affinity of intermediate and smaller multimer to collagen.

These findings suggest that the poor affinity of vWF of Types IIA, IIB and IIC vWD to collagen may be caused by abnormality of the collagen binding domain in vWF subunit.

#### Index Terms

von Willebrand factor, von Willebrand disease, hemophilia A, collagen binding, human Type III collagen

#### 緒 言

von Willebrand 病 (vWD) は出血時間の延長と皮膚

粘膜の出血を主徴とする常染色体遺伝性疾患で、今日、本疾患はヒト常染色体No.12 の von Willebrand 因子遺伝子 (12pter-p12) の欠陥による vWF 蛋白の量的ないし

質的合成障害症として把握されている<sup>1)2)3)</sup>。

ヒト血漿中の vWF は SDS アガロースゲル電気泳動法の解析で  $0.5 \sim 20 \times 10^6$  dalton におよぶ multimer band の series よりなることが観察され、この所見は vWD の病型分類に用いられ、現在 vWD は vWF:Ag (vWF 蛋白) は低下するも multimer の各 series は正常血漿のそれらと同様に存在する Type I, vWF:Ag は必ずしも低下しないが multimer 構成に異常のみられる Type II, vWF:Ag が欠如し全ての multimer を欠く Type III に大別されている<sup>4)</sup>。Type I は vWF 蛋白の量的合成障害症と考えられ、一方、Type II は vWF 蛋白の量的ならびに質的異常が存在するもので、IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH および Type B と呼ばれる subtype が報告されている。Type III は血漿 vWF の量的欠陥症で常染色体劣性に出現する病型である<sup>5-12)</sup>。

vWF の機能として in vitro では抗生剤の一種の ristocetin, あるいは蛇毒製剤 botrocetin 存在下に血小板膜上糖蛋白 I b (GPI b) に結合することが明らかにされている<sup>13)14)</sup>。In vivo ではヒト動脈内皮下組織への血小板粘着、血栓形成は vWF を介して行われることが Weiss et al.<sup>15)</sup>, Sakariassen et al.<sup>16)</sup>, Tschopp et al.<sup>17)</sup>, によって観察された。Nyman<sup>18)</sup> は数種の collagen 製剤のうち type III collagen が vWF を吸着することを報告し、Scott et al.<sup>20)</sup> は type I, II, III も同様の作用を示すことを観察した。これらの観察は主に純化 vWF, 血小板 collagen 反応であり、血漿中の vWF の collagen 結合の簡易測定法ではない。

すでに著者は in vitro において human placenta より得た type III fibrillar collagen を用い液相法で collagen 結合を測定する系を報告<sup>27)</sup>した。今回 vWD 各種患者および血友病 A 患者血漿中の vWF の collagen 結合につき vWF multimer 構成の変化とあわせて検討したので報告する。

## 対象および方法

1. 対象: von Willebrand 病 19 例 (Type I 9 例, Type IIA 6 例, Type IIB 3 例, Type IIC 1 例), 血友病 A 27 例について検索した。また正常成人男女それぞれ 5 人の血漿を等量ずつ混和しプール血漿を作製した。

2. 血漿: プラスチック製ディスボザブル注射器に 21 G 注射針を接続し、正常成人, von Willebrand 病患者および血友病 A 患者の各々肘静脈よりすみやかに採取した全血 9 容を直ちに 3.8% クエン酸ナトリウム 1 容の入ったプラスチック製試験管に加えて混和し、3,000 回転 15 分間遠心しクエン酸血漿を得た。これらの血漿を少量ずつ

プラスチックチューブに分注し、用に臨むまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

3. vWF:Ag の測定: 抗 vWF 家兎抗体を 1 次抗体とし、ペルオキシダーゼ標識抗 vWF 家兎抗体を 2 次抗体としたサンドウィッチ ELISA (DAKOPATS, Denmark) 法<sup>18)</sup>にて測定した。

4. リストセチンコファクター (Rcof): von Willebrand 試薬 (Behringwerke, Germany) を用いた肉眼的血小板凝集法<sup>21)</sup>によった。

5. ヒト type III fibrillar collagen 懸濁液の作製: 乾燥 type III soluble collagen from human placenta (SIGMA Chemical Co., St Louis Mo.) を  $0.1\text{mol/L}$  酢酸で濃度  $1.5\text{ mg/ml}$  に溶解し、 $4^{\circ}\text{C}$  下で 48 時間攪拌後リン酸水素二ナトリウム溶液 ( $20\text{mmol/L}$ , pH7.5) で 48 時間透析した後、再び  $4^{\circ}\text{C}$  下で 16 時間以上攪拌し使用した。

6. Collagen 結合 (Collagen binding): 第 I 報<sup>27)</sup>で述べたごとく血漿 vWF のヒト type III collagen への結合の測定は Duggan et al.<sup>22)</sup> の変法にて行った。

7. SDS-アガロース-ポリアクリルアミドゲル電気泳動: Chopek & Girma et al.<sup>23)</sup> の方法に準拠した。127×245×0.2 mm のゲルボンドフィルム (Pharmacia Co.) を 130×260×2 mm のガラス板にはりつけ、125×260×2 mm のゴム枠を乗せ、さらにガラス板をかぶせ四方をクリップでとめ、厚さ 2 mm のガラス板間隙に、0.1% SDS 加 6 M 尿素加 1.5% アクリルアミド加 1% アガロース液 (Seakem HGT-P 1g を 0.1% SDS 加 0.1 M トリス・リン酸緩衝液, pH7.0 で煮沸溶解した後その内の 33.8 ml を 32.4 g の尿素と 28.13 ml の 0.2% SDS 加 0.2 M トリス・リン酸緩衝液, pH7.0 と 1.8 ml の 0.6 M  $\text{Na}_4\text{-EDTA}$  溶液 pH7.4 を  $37^{\circ}\text{C}$  で溶解した溶液に加え、さらに 30% アクリルアミド加 1.5% メチレンビスアクリルアミド溶液 9 ml, 5% 過硫酸アンモニウム 1.8 ml, テトラメチレンジアミン 0.3 ml を加えて作製) を流下し  $4^{\circ}\text{C}$  で冷却した。ゲル化後ガラス板を外し、ゲルの四方を  $120 \times 250\text{ mm}$  になるよう切除した後、長辺端より 20 mm の位置に 5 mm 間隔で  $3 \times 13\text{ mm}$  の穴をあけ、試料  $50\mu\text{l}$  を添加した。試料は被検検体  $10\mu\text{l}$  に尿素 36 mg, 10% SDS  $10\mu\text{l}$ , 0.25% ブロムフェノールブルー  $5\mu\text{l}$  と泳動緩衝液  $20\mu\text{l}$  を加え  $65^{\circ}\text{C}$  15 分間加温したものを用いた。泳動は 0.1% SDS 加 0.1 M リン酸緩衝液 pH7.0 を泳動緩衝液とし LKB 社 (Sweden) 製電気泳動装置および DESAGE (German) 製冷却装置を用い  $10^{\circ}\text{C}$   $80\text{mV/gel}$  で 15 分間泳動後、孔を 0.1% SDS 加 1% アガロース加 0.1 M トリス・リン酸緩衝液, pH7.0 (Seakem HGT-P を 0.1% SDS 加 0.1 M

トリス・リン酸緩衝液 pH7.0 で沸騰溶解) で孔埋めした後, 50mV/gel で色素がゲルの他端に至るまで泳動した。8. オートラジオグラフィー: 泳動終了後, 10% トリクロロ酢酸加 50% メタノール溶液で 2 時間固定し蒸留水 1 L に 3 時間毎に水を交換しつつ 12 時間浸した。次いで 1% BSA 加 0.15 M 塩化ナトリウム加 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2 (Tween 20, 0.5 ml/L) で 3 時間浸した後,  $^{125}$ I 標識抗体槽に室温で 12 時間免疫固定し, PBS/Tween 緩衝液中に 24 時間さらに 3% 食塩水 2 L 中に 24 時間浸し, 0.9% 食塩水 2 L 中に 24 時間, 最後に蒸留水 2 L 中に 24 時間浸した。ゲルを乾燥後コダック NS-ST フィルムと Intensifying screen (Dupon Co.) を暗室で密栓させ,  $-70^{\circ}\text{C}$  6 時間感光後現像した。

各マルチマーの分子量の算定は Furlan et al.<sup>24)</sup> の方法に準じて, 純化 IgM (Cappel Laboratories) の重合物による泳動バンドと対比して行った。

## 成 績

1. vWD 各種病型および血友病 A 患者血漿中の collagen 結合, Rcof 活性および vWF: Ag

vWD の Type I 9 例, Type II A 7 例, IIB 3 例および IIC 1 例の計 20 例について collagen 結合を測定し Rcof 活性, vWF: Ag および vWF: Ag $\times$ collagen 結合/100 と対比検討した。

Type I では Rcof 活性 5% 以下 $\sim$ 38%, vWF: Ag 6% $\sim$ 46% と中等度に減少していた。collagen 結合は 83.6% $\sim$ 90.0% で, vWF: Ag $\times$ collagen 結合/100 と Rcof 活性の相関は,  $r=0.75$  で比較的良好に相関していた。Type II A では, Rcof 活性は 1 例の 12% を除き 5% 以下, vWF: Ag は 28% $\sim$ 55% と中等度に低下していた。collagen 結合は, 42.0% $\sim$ 76.1% で vWF: Ag $\times$

collagen 結合/100 と Rcof に相関を認めなかった。

Type IIB は, Rcof 活性 48% $\sim$ 56%, vWF: Ag 55% $\sim$ 68% と軽度の低下に留まり, collagen 結合は 68.0% $\sim$ 80.0% で, Rcof は vWF: Ag $\times$ collagen 結合/100 と相関傾向を認めた。Type IIC は Rcof 活性 5% 以下, vWF: Ag 48% であり collagen 結合は 35.8% と低下していた (Table. 1 及び Fig. 1)。

血友病 A 患者 27 名の collagen 結合は 91.0% $\sim$ 98.7% ( $97.0\pm 1.8\%$ ), Rcof 活性は 112% $\sim$ 360% ( $178\pm 61.2\%$ ), vWF: Ag は 66% $\sim$ 353% ( $181\pm 75.6\%$ ) で

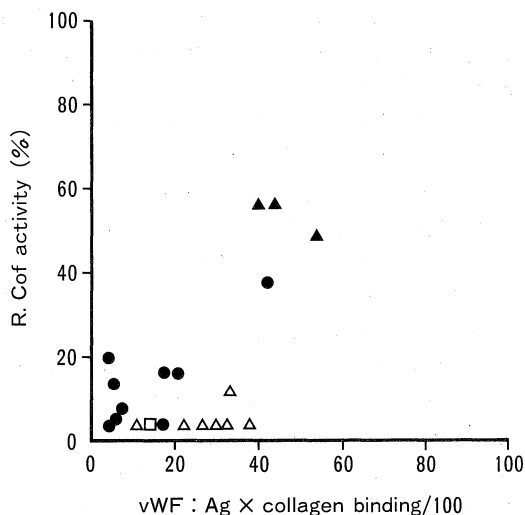


Fig. 1. Relationship between vWF: Ag  $\times$  collagen binding/100 and Rcof. Patients with type I are indicated as closed circles (●), type II A as open triangles (△), type IIB as closed triangles (▲) and type IIC as open square (□).

Table. 1. Collagen binding(CB), vWF: Ag, vWF: Ag $\times$ CB/100 and Rcof in plasma samples from patients with normal adult, Hemophilia A and von Willebrand disease

	Collagen binding(CB) (%)	vWF: Ag (%)	vWF: Ag $\times$ CB/100 (%)	Rcof (%)
Normal adult (n=50)	84.0 $\sim$ 98.1 (93.4 $\pm$ 2.6)	49 $\sim$ 220 (122.2 $\pm$ 34.1)	44.7 $\sim$ 210.8 (114.4 $\pm$ 33.2)	56 $\sim$ 240 (120.0 $\pm$ 31.3)
Hemophilia A (n=27)	91.0 $\sim$ 98.7 (97.0 $\pm$ 1.8)	66 $\sim$ 353 (181.6 $\pm$ 75.6)	98.6 $\sim$ 332.5 (175.3 $\pm$ 70.8)	112 $\sim$ 360 (178.7 $\pm$ 62.0)
von Willebrand disease				
Type I (n=9)	83.6 $\sim$ 90.0	6 $\sim$ 38	5.2 $\sim$ 41.2	5 $\sim$ 38
Type II A (n=7)	42.0 $\sim$ 77.1	28 $\sim$ 55	11.8 $\sim$ 38.5	<5 $\sim$ 12
Type IIB (n=3)	68.3 $\sim$ 80.2	56 $\sim$ 68	40.3 $\sim$ 54.4	48 $\sim$ 56
Type IIC (n=1)	35.8	48	17.2	<5

(mean $\pm$ SD)

あった. vWF:Ag  $\times$  collagen 結合 /100 は 98.6%  $\sim$  332.5% ( $175.3 \pm 70.8\%$ ) で Rcof 活性とよく相関していた ( $r=0.95$ ).

## 2. Collagen 結合後の上清及び沈渣よりの溶出物における multimer 構成

各種濃度の collagen と反応後の上清及び collagen に吸着された沈渣よりの溶出物における multimer 構成につき検討した.

成人ヒトプール血漿を生食で 50%, 20% に希釈しこれらを終濃度 31.2, 125, 500 および 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の collagen および heated collagen, 生食と 15 分間反応せしめた. 反応上清 10  $\mu\text{l}$  あるいは 0.01M PBS にて 3 回洗浄後の沈渣をオートラジオグラフィの試料とした. 上清の成人ヒトプール血漿原液においては collagen 濃度 750 および 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では smallest multimer のみが, collagen 濃度 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では薄い 2nd multimer が出現し, 31.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では smaller  $\sim$  intermediate bands が出現した. Heated collagen および生食と反応後の正常プール血漿では  $0.9 \sim 20 \times 10^6$  dalton に至る multimer series が出現した. 沈渣よりの溶出物の vWF multimer は上清のそれとは逆に collagen 濃度が 750 および 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では全 multimer series が出現し, collagen 濃度が 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$

/ml においては smallest bend の陰影がやや薄くなり, 31.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では smallest band は消失し larger  $\sim$  intermediate bands が出現した. Heated collagen および生食と反応後の沈渣では明かな multimer series は出現しなかった. 希釈血漿の上清中 vWF multimer は検体中の vWF:Ag 量の低下にともない各 collagen 濃度における higher bands が出現しにくくなり, 逆に沈渣よりの溶出物の multimer は原液では出現しにくかった smaller  $\sim$  intermediate bands が低い collagen 濃度においても明瞭に出現した (Fig. 2).

Type I vWD 患者血漿中の vWF は正常の vWF と同様  $0.9 \sim 20 \times 10^6$  dalton に及ぶ multimer series より成り立っていたが, 個々の multimer band の濃度は正常のそれに比し薄かった. Collagen と反応後の上清中の multimer は, collagen 濃度 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では smallest band のみが, collagen 濃度 31.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では, intermediate band までが出現した. 溶出物では成人ヒトプール血漿と同様各種濃度の collagen で上清中より消失した multimer series が出現した.

Type IIA 患者血漿中の vWF は分子量  $0.9 \sim 5 \times 10^6$  dalton の範囲内に 4 本の smaller multimer の bands が出現した. このうち上部の 2 本の band の陰影は薄かつ

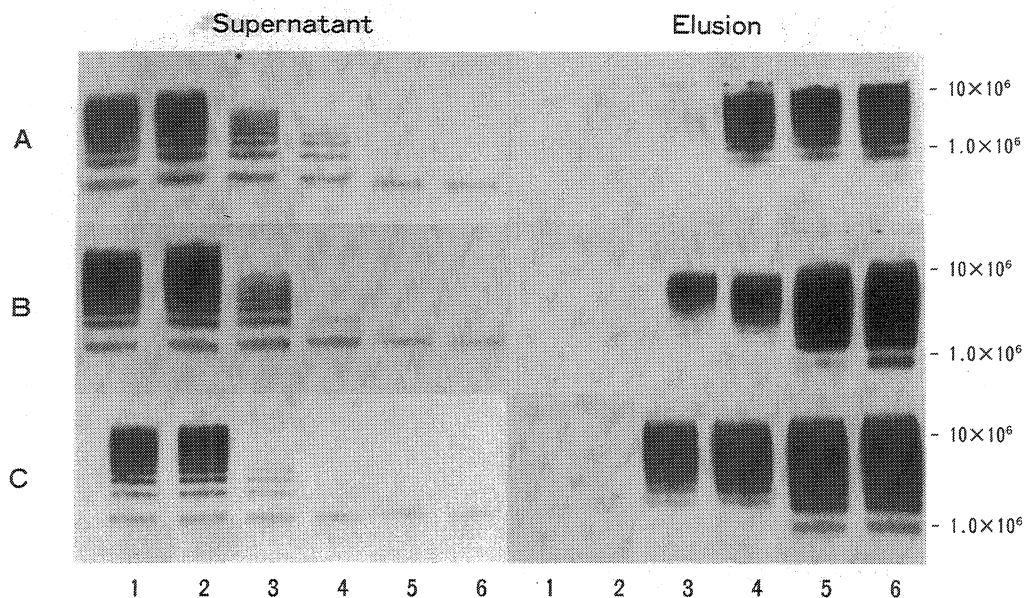


Fig. 2. Multimer analysis in the supernatant and elution after collagen binding with variously diluted normal plasma.

A: undiluted plasma, B: 1:1 diluted with saline, C: 1:5 diluted with saline, 1: control sample plasma, 2: 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of heated collagen, 3: 31.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen, 4: 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen, 5: 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen, 6: 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen.

たが、他の2本のbandは正常の smaller multimer の陰影に比して濃度が増加していた。上清中の multimer は collagen 濃度  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  までは smallest band のみが出現し、 $125\mu\text{g}/\text{ml}$  で 2nd band までが、 $31.2\mu\text{g}/\text{ml}$  で 3rd band まで出現した。溶出物の multimer 構成は上清と逆に collagen 濃度が  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  までは smallest band の陰影がやや低下し、その後 smallest multimer より順次消失したが、collagen 濃度  $31.2\mu\text{g}/\text{ml}$  でも smallest band が3本残存した。

Type IIB 患者血漿中の vWF は分子量  $0.9\sim 8.5\times 10^6$  dalton の範囲内に 9~10 本の multimer bands より構成されていた。上清中の multimer は collagen 濃度  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  以上では smallest band のみが出現し、collagen 濃度  $125\mu\text{g}/\text{ml}$  では 2nd band 以下の smallest bands が、collagen 濃度  $31.2\mu\text{g}/\text{ml}$  では intermediate bands 以下が出現した。溶出物の multimer 構成は collagen 濃度  $750\mu\text{g}/\text{ml}$  では、薄い smallest band と intermediate band が出現し、collagen 濃度が低下するに従い smallest band から順次消失した。

Type IIC 患者血漿中の vWF は分子量  $0.9\sim 4\times 10^6$  dalton の範囲内に 4~5 本の smaller multimer bands

が出現した。このうち smallest band は正常の smallest band の陰影に比して著明に濃度が増し、それより上部の band の陰影は逆に薄かった。上清中の multimer は、collagen 濃度  $750\mu\text{g}/\text{ml}$  では 2nd band 以上の series は認めなかった。Collagen 濃度の低下とともに、2nd band 以上の smallest band が出現し、collagen 濃度  $31.2\mu\text{g}/\text{ml}$  で 4th band まで出現した。溶出物の multimer 構成は collagen 濃度  $750\mu\text{g}/\text{ml}$  で 2nd band 以上の series と非常に薄い smallest band が出現した。Collagen 濃度  $125\mu\text{g}/\text{ml}$  では 2nd band 以上の smallest bands が出現し、 $31.2\mu\text{g}/\text{ml}$  では不明瞭な 3rd band 以上の smaller multimer が認められた (Fig. 3)。

## 考 案

vWF が障害血管内皮下組織への血小板の粘着に必須の血漿因子であることは、Baumgartner et al.<sup>25)</sup>の血管内皮損傷ウサギ動脈片を用いた灌流実験により、von Willebrand 病 (vWD) の血小板多血漿の灌流では内皮下組織への血小板粘着が低下しているが、vWF 添加により正常化することから明らかとなった。vWF と結合する血管内皮下組織の主成分は collagen 線維で I~VI

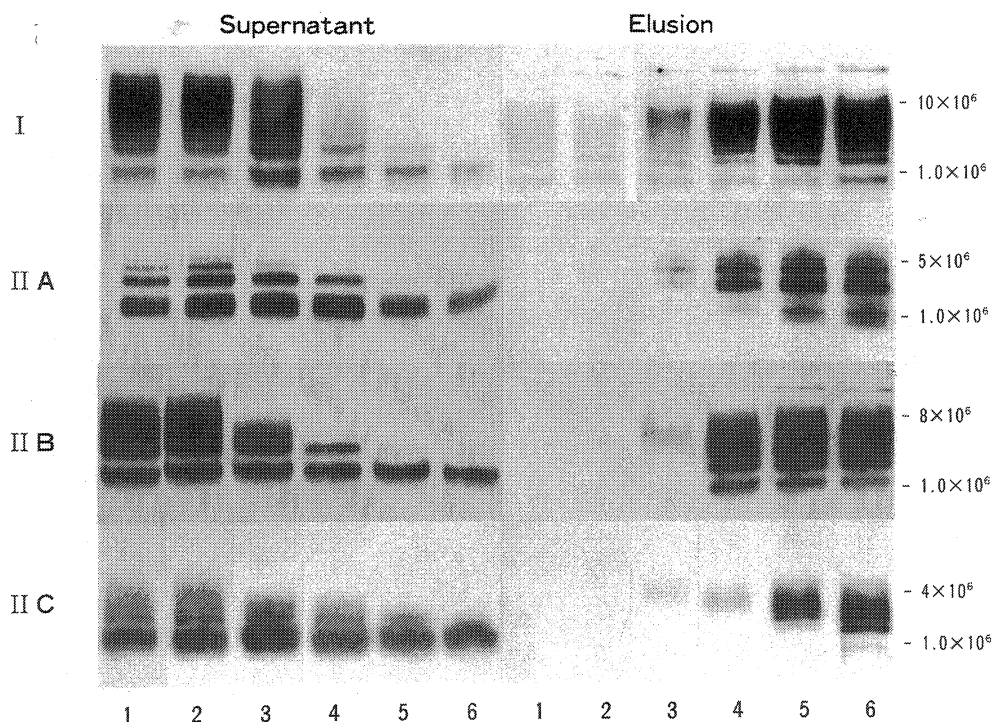


Fig. 3. Multimer analysis in the supernatant and elution after collagen binding with plasma of von willebrand disease. 1: control sample plasma, 2:  $750\mu\text{g}/\text{ml}$  of heated collagen, 3:  $31.2\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen, 4:  $125\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen, 5:  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen, 6:  $750\mu\text{g}/\text{ml}$  of collagen.

型 collagen のうち III 型 collagen が最も結合が強いことが知られるようになった<sup>26)</sup>。vWD の各病型の内皮下組織への血小板結合を Baumgartner の灌流実験法で routine に観察することは容易でない。著者はヒト臍帯より得られた type III fibrillar collagen の vWF 結合が強いことに着目して、血漿中の vWF の collagen 結合を測定する方法を考案し、その条件及び正常血漿中の vWF の結合について第 I 報で述べた<sup>27)</sup>。つづいて今回、vWD 患者及び血友病 A 患者血漿中の collagen 結合について検討した。

vWF: Ag 量が 5 % 以下～49 % と低下するも multimer 構成は正常であった Type I vWD 9 例の血漿 vWF の collagen 結合は  $87.8 \pm 2.4$  % で、正常血漿のそれと差異は認めなかった。本法では collagen 濃度  $750 \mu\text{g/ml}$  で結合吸着されて上清中に残存する vWF: Ag 量と結合力のない加熱 collagen と反応後の上清 vWF: Ag 量の差より collagen 結合を求めるものである。Collagen と反応する血漿中の vWF: Ag 量が低下している場合、その反応性自体に異常がなければ相対的に過剰な collagen に結合吸着され collagen 結合は正常値を示すことになる。Type I vWD では vWF: Ag 量が低下していても multimer 構成は正常であるので collagen への結合性も正常を示したものと考えられる。従って本法は vWF: Ag 量に対応した collagen への結合を測定している系ではないので、抗原量に対応した結合を求めると vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 で示しうる。Type I 患者の vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は  $14.4 \pm 11.9$  % で正常成人の  $114.4 \pm 33.2$  % に比し著しく低値を示した。vWF 蛋白の質的異常の病型は Type II と総称されるが、そのうち larger 及び intermediate multimer が欠如しかつ ristocetin 凝集が著しく低下する Type IIA の 8 例では vWF: Ag は 28～55 % と軽度低下していた。Collagen 結合は  $62.1 \pm 11.9$  % で vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は  $28.0 \pm 8.6$  % を示し、Type I より高値であった。Type IIB は larger multimer は欠如するが低濃度の ristocetin で血小板凝集が惹起される病型である。3 例の Type IIB 患者血漿では collagen 結合は  $76.0 \pm 11.0$  %、vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は  $46.4 \pm 7.3$  % で Type IIA より高値を示した。Type IIC は multimer 構成で single band を反復し且つ smallest multimer が増加する特徴を有するが 1 例の患者血漿の collagen 結合は 35.8 % で vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は 17.2 % に低下していた。Type III vWD は vWF 蛋白の欠如する病型で、vWF: Ag 量は著しく低下するため本病型患者血漿の collagen

結合は測定し得なかった。

血友病 A 患者 27 例の血漿の collagen 結合は  $97.0 \pm 1.8$  % で vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は  $175.3 \pm 70.8$  % と正常人の  $114.4 \pm 33.2$  % より高値を示したが、血友病 A の vWF: Ag 量が正常人より増加していることによると考えられた。

以上のごとく、本法による血漿 vWF の collagen 結合は vWF: Ag が低下するも vWF multimer 構成の正常な Type I vWD では正常値を示し、vWF: Ag 量が Type I より増加しているにもかかわらず vWF multimer 構成の異常を示す Type IIA, IIB および IIC では血漿 vWF の collagen 結合は低下することを認めた。これらの所見は vWF の collagen 結合が vWF multimer 構成と密接に関係していることを示唆するものである。著者は vWF の collagen 結合が vWF multimer series のどの組成と関連しているかについて検討した。正常人血漿に終濃度 31.2, 125, 500 および  $750 \mu\text{g/ml}$  の collagen を添加し、結合吸着された vWF: Ag の multimer series の変化を上清及び吸着後の溶出物について観察すると上清と溶出物の multimer の変動はよく対応していた。collagen 濃度  $31.5 \mu\text{g/ml}$  で結合吸着される vWF multimer は larger ~ intermediate bands で smaller multimer は吸着されず残存し collagen 濃度  $500 \mu\text{g/ml}$  以上では smaller band も吸着された。血漿を生食で 50 %, 20 % に希釈するにつれ vWF multimer は collagen によく吸着され collagen 濃度  $31.2 \mu\text{g/ml}$  で smaller multimer が吸着されず残存するのみであった。

vWF: Ag 量が 14 % の Type I vWD 患者血漿の collagen 吸着態度は正常血漿のそれに類似し collagen 濃度  $500 \mu\text{g/ml}$  で larger multimer が吸着されるも smaller multimer は残存していたが  $500 \mu\text{g/ml}$  では intermediate multimer も吸着された。Larger multimer 及び intermediate multimer を欠く Type IIA vWD 患者では 2nd multimer は collagen 濃度  $125 \mu\text{g/ml}$  で吸着されず  $750 \mu\text{g/ml}$  でも濃い smallest multimer が出現した。Larger multimer を欠く Type IIB vWD 患者は collagen 濃度  $31.2 \mu\text{g/ml}$  では intermediate multimer は吸着されず  $750 \mu\text{g/ml}$  では smallest band のみが出現した。Larger multimer が欠如し且つ各 intermediate および smaller multimer は mono-band であるが smallest band が増加している Type IIC 病型では collagen 濃度  $125 \mu\text{g/ml}$  では濃い smaller multimer が出現し  $750 \mu\text{g/ml}$  でも増強した smallest band が認められた。従って Type I vWD の vWF multimer series の collagen affinity は正常と同様であり、そのうち larger

multimer の affinity が最も良好であったが larger multimer を欠く Type II では multimer series の異常が認められ collagen への affinity も低下していた。

Type II vWD においては vWF larger multimer の欠如に加えて, intermediate あるいは smaller multimer のそれぞれの band の構造異常が存在することが知られている。vWF multimer の subunit にはアミノ酸残基 911~1114 に collagen binding domain が存在している<sup>28-31)</sup>が, Type IIA, IIB, IIC の collagen 結合異常は subunit level における collagen binding domain の質的異常が collagen 結合異常に関連しているものと推察された。

## 結 語

vWD 患者および血友病 A 患者血漿中の vWF の collagen 結合を測定するとともに, collagen 結合に伴う vWF multimer 構成の推移につき検討した。

1. vWD 患者の collagen 結合は Type I vWD 83.6% ~90.0%, Type IIA 42.0%~76.1%, Type IIB 68.0%~80.0%, Type IIC 35.8%であった。血友病 A 患者の collagen 結合は 91.0%~98.7% (97.0±1.8%) であった。

2. 正常 vWF multimer 構成における collagen との affinity は larger multimer が最も強く, intermediate, smaller multimer の順に低下した。Type I vWD の各 multimer band は正常とほぼ同様の affinity を示した。Multimer series の異常を有する Type II vWD では intermediate 及び smaller band の collagen への affinity は低下していた。

本論文の要旨は, 第 51 回日本血液学会総会において発表した。なお, 本研究は昭和 63 年度及び平成元年度文部省科研重点領域研究「血栓性素因の分子生物学的解析とその臨床応用」の助成を得た。

## 文 献

- 1) Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S. : von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 70 : 895-904, 1987.
- 2) Ginsburg, D., Handin, R. I., Bonthron, D. T., Doonlon, T. A., Brauns, G. A. P., Latt, S. A. and Orkin, S. H. : Human von Willebrand factor (vWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal location. *Science* 228 : 1401-1406, 1985.
- 3) 清水信義 : ヒト染色体の遺伝子マッピング。日本臨

牀 47 増刊 DNA 診断 : 20-58, 1989.

- 4) Hoyer, L. W., Rizza, C. R., Tuddeham, E. G. D., Carta, C. A., Armtage, H. and Rotblat, F. : Von Willebrand factor multimer patterns in von Willebrand's disease. *Br. J. Haematol.* 55 : 493-507, 1983.
- 5) Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S. : Variant von Willebrand's disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J. Clin. Invest.* 65 : 1318-1325, 1980.
- 6) Ruggeri, Z. M., Nilsson, I. M., Lombardi, R., Holmberg, L. and Zimmerman, T. S. : Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (Type IIC). *J. Clin. Invest.* 70 : 1124-1127, 1982.
- 7) Kinoshita, S., Harrison, J., Lazerson, J. and Abildgaard, C. F. : A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric patterns of factor VIII-related antigen (Type IID). *Blood* 63 : 1369-1371, 1984.
- 8) Zimmerman, T. S., Dent, J. A., Ruggeri, Z. M. and Nannini, L. H. : Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (Type IIC, IID and IIE). *J. Clin. Invest.* 77 : 947-951, 1986.
- 9) Mannucci, R. M., Lombardi, R., Federici, A. B., Dent, J. A., Zimmerman, T. S. and Ruggeri, Z. M. : A new variant of type II von Willebrand disease with aberrant multimeric structure of plasma but not platelet von Willebrand factor (Type IIF). *Blood* 68 : 269-274, 1986.
- 10) Gralnick, H. R., Williams, S. B., McKeown, L. P., Maisonneuve, P., Jenneau, C. and Sultan, Y. : A variant of type II von Willebrand disease with an abnormal triplet structure and discordant effects of protease inhibitors on plasma and platelet von Willebrand factor structure. *Am. J. Hematol.* 24 : 259-266, 1987.
- 11) Mannucci, P. M. : High-resolution multimeric analysis identifies a new variant of type II von

- Willebrand's disease (Type IIH) inherited in an autosomal recessive manner. *La Ricerca in Clinicae in Laboratorio* **26**: 237-245, 1986.
- 12) Howard, M. A., Salem, H. H., Thomas, K. B., Hau, L., Coghlan, M. and Firkin, B. G. : Variant von Willebrand's disease type B revisited. *Blood* **60**: 1420-1428, 1982.
- 13) 西尾健治: 蛇毒Botrocetinで発現される von Willebrand因子活性に関する研究. *奈医誌*. **41**: 19-29, 1990.
- 14) Fujimura, Y., Titani, K., Holl, Z., Russel, S. R., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S. : von Willebrand factor: a reduced and alkylated 52/48KDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein I b. *J. Biol. Chem.* **261**: 381-385, 1986.
- 15) Weiss, H. J., Baumgartner, H. R., Tschopp, T. B., Turitto, V. T. and Cohen, D. : Correction by factor VIII of the impaired platelet adhesion to subendothelium in von Willebrand's disease. *Blood* **51**: 267-279, 1978.
- 16) Sakariassen, K. S., Bolhuis, P. A. and Sixma, J. J. : Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* **279**: 636-638, 1979.
- 17) Tschopp, T. B., Weiss, H. J. and Baumgartner, H. R. : Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.* **83**: 296-300, 1974.
- 18) 高瀬俊夫: フォン・ウィルブラント因子の測定法(2). *検査と技術* **15**: 1283-1287, 1987.
- 19) Nyman, D. : von Willebrand factor dependent platelet aggregation and adsorption of factor VIII related antigen by collagen. *Thromb. Res.* **17**: 209-214, 1980.
- 20) Scott, D. M., Griffin, B., Pepper, D. S. and Barnes, M. J. : The binding of purified factor VIII /von Willebrand factor to collagens of differing type and form. *Thromb. Res.* **24**: 467-472, 1981.
- 21) 高瀬俊夫, 吉川 昇, 植木一博, 岡本裕宏, 安居資司, 福井 弘: RIPA-testkitを用いた von Willebrand因子活性の測定. *診療と新薬* **19**: 157-161, 1982.
- 22) Duggan, M. J., DiMichele, D. M., Christian, M. J., Finp, L. M. and Hathaway, W. E. : Collagen-binding of von Willebrand's factor antigen in the classification of von Willebrand's disease. *Am. J. Clin. Pathol.* **88**: 97-102, 1987.
- 23) Chopek, M. W., Girma, J. P., Fujiwara, K., Davie, E. W. and Titani, K. : Human von Willebrand factor: A multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* **25**: 3146-3155, 1986.
- 24) Furlan, M. and Beck, E. A. : Cross-linking of human fibrinogen with glutaraldehyde and tetranitromethane. *Thromb. Res.* **7**: 827-838, 1975.
- 25) Baumgartner, H. R., Tschopp, T. B. and Meyer, D. : Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. *Br. J. Haematol.* **44**: 127-139, 1980.
- 26) Santoro, S. A. : Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. *Thromb. Res.* **21**: 689-693, 1981.
- 27) 西久保敏也: von Willebrand因子 (vWF) の collagenへの結合に関する研究. I. 正常血漿中の vWF の collagen 結合. *奈医誌*. **41**: 555-561, 1990.
- 28) Sixma, J. J., Sakariassen, K. S., Stel, H. V., Houdijk, W. P. M., Maur, D. W., Hamer, R. J., de Groot, P. G. and Mourik, J. A. : Functional domains on von Willebrand factor recognition of discrete tryptic fragments by monoclonal antibodies that inhibit interaction of von Willebrand factor with platelets and with collagen. *J. Clin. Invest.* **74**: 736-744, 1984.
- 29) Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J. P. and Meyer, D. : Localization of a collagen interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues gly 911 and glu 1365. *Blood* **70**: 1577-1583, 1987.
- 30) Roth, G. J., Titani, K., Hoyer, L. W. and Hickey, M. J. : Localization of binding sites within human von Willebrand factor for monomeric type III collagen. *Biochemistry* **25**: 8357-8361, 1986.
- 31) Pareti, F. I., Niiya, K., McPherson, J. M. and



**Ruggeri, Z. M.:** Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor

that interact with fibrillar collagen type I and III. *J. Biol. Chem.* **262**: 13835-13841, 1987.